

## JP62228166

Publication Title:

METHOD OF DETECTING ONE OF LIGAND-RECEPTOR PAIR,  
PREPARATION OF CARRIER WITH WHICH ONE OF LIGAND-RECEPTOR  
PAIR IS COUPLED AND ANALYZER PROPER FOR EXECUTING THESE  
METHOD

Abstract:

Abstract not available for JP62228166

Abstract of corresponding document: EP0233385

A method for detecting a member of a ligand-receptor pair, such as an antigen-antibody pair, in which a carrier of porous material, to which the member of the ligand-receptor pair to be detected is bonded, is brought into contact with a liquid (to be analysed) in which the other member (to be detected) is present or is suspected to be present, and the formation of the ligand-receptor complex is detected, wherein the liquid to be analysed is made to pass at a regulated velocity through the carrier during the reaction in which the formation of the complex takes place, the preparation of such a carrier as well as an analysis equipment suitable for carrying out such a method (dot immunobinding assay).  
Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

-----  
Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭62-228166

⑤ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)10月7日

G 01 N 33/543  
33/545  
33/548C-7906-2G  
A-7906-2G  
A-7906-2G

審査請求 未請求 発明の数 5 (全8頁)

⑭ 発明の名称 リガンド-レセプター対の一方を検出する方法、リガンド-レセプター対の一方が結合した担体の調製法及びこれら方法実施のために好適な分析装置

⑮ 特 願 昭62-5879

⑯ 出 願 昭62(1987)1月13日

優先権主張 ⑰ 1986年1月13日 ⑱ オランダ(NL) ⑲ 8600056

⑳ 発 明 者 バン エイユク, ロナルド ビクター ヴィルヘルムス オランダ国 ブニツク, ホエフィユゼラール 22

㉑ 発 明 者 イュスセルムイデン, オットー エマヌエル オランダ国 ザ ハーグ, セグルストラート 12

㉒ 出 願 人 オ ラ ン ダ 国 オランダ国 レイドスケンダム, ピー. オー. ボックス 439

㉓ 代 理 人 弁理士 浅 村 皓 外2名

明細書の浄書(内容に変更なし)

明 細 書

## 1. 発明の名称

リガンド-レセプター対の一方を検出する方法、リガンド-レセプター対の一方が結合した担体の調製法及びこれら方法実施のために好適な分析装置

## 2. 特許請求の範囲

(1) リガンド-レセプター対の検出対象である一方が結合した多孔質担体を、リガンド-レセプター対の他方(検出対象である)を含むあるいは含むと考えられる液体(分析対象である)と接触せしめて、形成されるリガンド-レセプター複合体を検出することからなる、リガンド-レセプター対の一方を検出する方法において、分析対象である液体を、一定の流速で担体を通過せしめ、その間に複合体形成反応を生ぜしめることを特徴とする方法。

(2) 分析対象である液体の、担体を通過する流速を、少なくとも検出し得る位の複合体が形成されるような速度に調整する特許請求の範囲第1項の

方法。

(3) リガンド-レセプター対が抗原-抗体対であり、分析対象である液体の、担体を通過する流速が  $0.1 - 50 \text{ ml/cm}^2/\text{min}$  である特許請求の範囲第1項または第2項の方法。

(4) ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートが、分析対象である液体中に、0.05 - 1 容積% 加えられている特許請求の範囲第2項または第3項の方法。

(5) リガンド-レセプター対の一方が共有結合あるいは非共有結合した担体であつて、請求の範囲第1項から第4項の1つあるいはそれ以上の方法に用いるための担体の調製法であつて、共有結合の場合にはリガンド-レセプター対の一方を含む液体を活性化された担体に適用し、非共有結合の場合には、該一方を含む液体を非活性化担体に適用し次いで担体を適して吸引することを経る方法。

(6) リガンド-レセプター対の複合体形成を、臨界ミセル濃度(CMC)以下の量の溶剤を加えて改

替する特許請求の範囲第5項記載の方法。

(7) 酵素免疫濾過測定法により、以下の工程を実施して、非競合法に従つて、抗体または抗原を検出する方法：

(a) ニトロセルロース膜のような乾燥担体を湿らす；

(b) 抗原または抗体を含む液体を担体に適用し、次いですぐに担体を通して吸引し、抗原を含む液体は、随意にCMC以下の量の溶剤を含有していてもよく、グルタルジアルデヒドで処理したニトロセルロース担体のような活性化担体に、抗体または抗原を共有結合せしめてもよく、

(c) 随意に、4℃で担体を密閉容器中で保存し、

(d) 随意に、Tween 20を含む溶液を用いて減圧下に担体を湿らして、担体上の未結合部位を塞ぎ、担体への非特異的結合を阻止せしめ、

(e) サンプル、すなわち第1抗体あるいは抗原を含む液体、または第1抗体あるいは抗原を含むと考えられる液体を、抗原または抗体を含む担体に適用し、サンプルを流速0.1 - 50 ml/cm<sup>2</sup>/

方法；

(b) 特許請求の範囲第7項のステップ(b)と類似の方法；

(c) 特許請求の範囲第7項のステップ(c)と類似の方法；

(d) 特許請求の範囲第7項のステップ(d)と類似の方法；

(e) 特許請求の範囲第7項のステップ(e)と類似の方法；

(f) 特許請求の範囲第7項のステップ(f)と類似の方法；

(g) シグナル発生システムでラベル化された抗体あるいは抗原を担体に適用し、サンプルを、流速0.1 - 50 ml/cm<sup>2</sup>/minで減圧または加圧下に担体を通して吸引または加圧し、Tween 20を、好ましくは0.05 - 1容積%でサンプルに加え、

(h) 特許請求の範囲第7項のステップ(h)と類似の方法；及び

(i) 特許請求の範囲第7項のステップ(i)と類似の方法を実施する。

minで減圧下または加圧下に担体を通して吸引または加圧し、好ましくはTween 20を0.05 - 1容積%でサンプルに加え、

(f) 担体を、好ましくはTween 20を0.5容積%加えた水で洗浄し、洗浄液を担体を通して吸引または加圧し、

(g) シグナル発生システムでラベル化した抗体を加えて、ステップ(e)の如くに、担体を通して液体を吸引または加圧し、また該ステップ(g)の前に、随意に非ラベル化抗体を加え、ステップ(e)の如くに、0.05 - 1容積%のTween 20をサンプルに加えることもでき、

(h) ステップ(f)の如く担体を洗浄し、

(i) 吸引により担体を洗浄し、担体上のラベル化複合体の量を、用いたシグナル発生システムに採用される測定法により測定する。

(8) 酵素免疫濾過測定法により、以下の工程を実施して、非競合法に従つて、抗体または抗原を検出する方法；

(a) 特許請求範囲第7項のステップ(a)と類似の

(9) 分析装置であつて、使用中の状態でその上部から下部へと見た時、多数の穴を持つたサンプル受けプレート、担体、担体とサンプル受けプレートの間にあつて穴の部分に適合したシール、及び穴を持つた支持プレートからなり、該支持プレートの穴は取り付けた状態においてはサンプル受けプレートの穴と一致しており、該支持プレートは、それを減圧下に置くための連結部を有している分析装置であつて；担体と支持プレートの間にあつて支持プレートの穴の部分に更にシールが取り付けられており、該シールは上記したシールと一致しており、本質的に同様の内径を有することを特徴とする分析装置。

(10) 支持プレート上に、シールを部分的に受けるための溝が設けられている特許請求の範囲第9項の装置。

(11) シールが、O-リング、卵形あるいはひずんだ長円形からなる特許請求の範囲第9項又は第10項の装置。

(12) シールが少なくともひずんだ物体の2層から

なる特許請求の範囲第9項-第11項の装置。

03 シールの表面に高い部分が設けられている特許請求の範囲第9項-第12項の装置。

### 3. 発明の詳細な説明

本発明は、リガンド-レセプター対の検出対象でない一方が結合した多孔質担体を、リガンド-レセプター対の他方(検出対象)を含むあるいは含むと考えられる液体(分析対象)と接触せしめて、形成されるリガンド-レセプター複合体を検出することによる、リガンド-レセプター対の一方を検出する方法に関する。リガンド-レセプター対は、リガンド-抗リガンド対とも言えるものであり、これは、抗原と抗体から成る免疫学的なペアーを含むものである。

免疫学的なペアーに関してのこのような方法としては、ドット(dot)免疫結合測定法が知られている(Hawkesら、Analytical Biochemistry 119, 142-147(1982))。かかる方法は、酵素免疫測定法の1つと考えられるものであり、例えばニトロセルロースなどの濾過膜を、

触する必要がある。このために、少なくとも1時間インキュベーションが必要である。

上述した方法において、分析すべき液体を一定の速度で担体を通過せしめ、その間に複合体の形成を生ぜしめることにより、インキュベーション時間が著しく短縮されることを見出した。本発明によれば、かかる流速を、加圧あるいは減圧により調整できる。かかる工程により、リガンド-レセプター対の一方が、担体上に、点状、線状あるいは他の形で結合される。

本発明によれば、抗原あるいは抗体の結合反応が、例えば、多孔質で出来た担体への加圧下にあるいは吸引濾過のもとに起こる。かかる担体としては、例えばニトロセルロース、セルロース(アセテート)、ポリアミド等よりなる濾過膜がある。本発明により、従来法のインキュベーション時間よりも、10-15倍、反応時間を短縮することが可能である。本発明では、反応すべき物質が、強制的に移動することになり、通常の酵素免疫測定法の場合には、反応すべき物質は、拡散によつ

担体として使用している。抗体あるいは抗原のニトロセルロースへの固定化(免疫学的ペアーを形成する)が急速に進み、そして分析すべき液体が反応する表面部位が少いため、必要とする抗体あるいは抗原の量は、これらの酵素免疫測定法の場合には、通常の場合よりもはるかに少ない。このような測定法の感度は、通常の酵素免疫測定法と同等またはそれ以上である。加えて、担体としてニトロセルロースを使用するため、測定結果を、バックグラウンドと対象させて評価することができる。その結果、特異的反応と非特異的反応を容易に区別することができる。

Hawkesらによつて記載されたインキュベーション法は、通常の酵素免疫測定法の場合と同様である。すなわち、抗体あるいは抗原が固定化された担体を、抗原あるいは抗体を含む溶液に接触せしめるものである。そして抗原に結合した抗体あるいは抗体に結合した抗原を、酵素が結合した第2抗体及び発色反応により検出するものである。抗体は、拡散によつて、(固定化された)抗原と接

て他の物質へ移動する必要がある、この場合に比べて、本発明によれば、はるかに早く反応が進行する。

本発明によれば、分析すべき液体が、担体を通過する流速は、好ましくは、検出し得る量の複合体が形成し得るような速度に調整される。一般に、抗原-抗体反応の場合に、この流速は、0.1 - 50 ml/cm<sup>2</sup>/minである。

好ましくは、分析すべきサンプルにポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートを加えて、担体へ抗体あるいは抗原が非特異的に結合するのを阻止せしめるのが良い。この場合、Tween 20の名で販売されているポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートが、牛血清アルブミンよりもよい結果を与える。Tween 20は、好ましくは、0.05 - 1 容量%の濃度で加える。

本発明はまた、抗原が結合した担体であつて、上述した方法に使用することのできる担体の調製法に関する。この方法においては、非共有結合の場合には、抗原を含む液体を担体に適用し、すぐ

に担体を通して吸引する(減圧下)。そして共有結合の場合には、抗原あるいは抗体を含む液体を、例えばグルタルジアルデヒドあるいは他の二官能性試薬で処理したニトロセルロースのような活性化担体に適用する。

この場合には、溶剤を、臨界ミセル濃度(CMC)以下の量で加えるのが好ましく、これによつて、免疫学的ペアーの複合体形成が改善される。この目的のために、例えば Zwitter-gent 3-14 の名で販売されている溶剤(3-テトラデシルジメチルアンモニオ-1-プロパンスルフェート)、オクチル- $\beta$ -D-グリコピラノシド、オクチル- $\beta$ -D-チオグリコピラノシドなどが溶剤として用いられる。

本発明によれば、酵素免疫過剰測定法により、以下の工程に従つて、非競合的に、抗体または抗原を検出することができる。

すなわち、

(a) ニトロセルロース膜のような乾燥担体を固らす；

%加えた水で洗浄し、洗浄液を担体を通して吸引または加圧し、

(g) シグナル発生システムでラベル化した抗体を加えて、ステップ(e)の如くに担体を通して液体を吸引及び/又は加圧し、また該ステップ(g)の前に、随意に非ラベル化抗体を加え、ステップ(e)の如くに、0.05-1容量%の Tween 20 をサンプルに加えることもでき、

(h) ステップ(f)の如くに担体を洗浄し、

(i) 吸引により担体を乾燥し、担体上のラベル化複合体の量を、シグナル発生システムに採用される測定法により測定する。これに関しては、例えば分光光度計、放射活性測定、顕微鏡検査法、(コンピューターコントロール)テレビジョンカメラなどが使用できる。

上記したステップ(a)では、Zwittergent 3-14 が好ましく使用される。

上記したステップ(g)では、例えば色原体、触媒反応、放射活性標識などの如きシグナル発生システムが用いられる。

(b) 抗原または抗体を含む液体を担体に適用し、次いですぐに担体を通して吸引し、抗原を含む液体は、随意に CMC 以下の量の溶剤を含有せしめ、また 0.1 重量%のグルタルジアルデヒドで処理したニトロセルロース担体のような活性化担体に、抗体または抗原を共有結合せしめてもよく、

(c) 随意に、例えば 4℃の如き低温で、担体を密閉容器中で保存し、

(d) 随意に、例えば Tween 20 を 20 容量%含む溶液を用いて、減圧下に担体を湿らして、担体上の未結合部位を濡れ、担体への非特異的結合を阻止し、

(e) サンプル、すなわち第1抗体あるいは抗原を含む液体、あるいは第1抗体あるいは抗原を含むと考えられる液体を、抗原または抗体を含む担体に適用し、サンプルを流速 0.1-50 ml/cm<sup>2</sup>/min で減圧または加圧下に担体を通して吸引または加圧し、好ましくは、Tween 20 を、0.05-1 容量%でサンプルに加え、

(f) 担体を、好ましくは Tween 20 を 0.5 容量

競合法の場合には、上述した(a)-(f)の工程を最初に実施し、次いでステップ(g)すなわち、

(g) シグナル発生システムでラベル化された抗体あるいは抗原を担体に適用し、サンプルを、流速 0.1-50 ml/cm<sup>2</sup>/min で、減圧または加圧下に、担体を通して吸引または加圧し、Tween 20 を好ましくは 0.05-1 容量%でサンプルに加え、

次いで、上述した非競合法のステップ(b)及び(i)を実施する。

本発明はまた、分析装置に関し、該装置は、使用中の状態でその上部から下部へと見た時、多数の穴を持つたサンプル受けプレート、担体、担体とサンプル受けプレートの間にあつて穴の部分に適合したシール(ガスケット)、及び穴を持つた支持プレートからなり、該支持プレートの穴は、取り付けた状態においてはサンプル受けプレートの穴と一致しており、該支持体は、それを減圧下に置くための連結部を有している装置であつて；担体と支持プレートの間にあつて支持プレートの穴の部分に更にシールが取り付けられており、該

シールは上記したシールと一致しており、本質的に同様の内径を有することを特徴とする装置である。支持プレートには、溝が、シールを部分的に受けるために、好ましくは取り付けられる。このシールは好ましくはＯ－リングからなり、また卵形あるいは長円形のリングも使用することができる。この後者の代わりに、例えば穴のあいたポリシロキサランバーの如き、ひずんだ二層の物体を用いることもでき、この場合、この層の間に担体がつかりと締め付けられる。このようなひずんだ層の穴は、もちろん、サンプル受けプレート及び支持プレートの穴と一致していなければならない。

長円形のシールは、いわゆるイムノプロット法の場合に有利に用いられ、この場合には、長円形の反応スポットが現われる。

本発明においては、リガンド－レセプター対の形成が起こる反応領域は、ひずんだ物体の小さな細片の間で、しつかりと締められた担体（フィルター）の端でかこまれているのが好ましく、かく

少現われるようになつてきた。この結果、臨床上の調査による正確な診断が可能であるばかりでなく、実験室上の調査も重要な要素となつて来た。本発明による方法及び装置により、かかる免疫学的調査を非常に早く行なうことができるようになり、患者はその場でその結果を待つことができ、新たな予約を取つて、治療を続ける必要性がなくなつた。また、この点に関して、注目すべきは、通常の酵素免疫測定法（ELISA）の場合には、結果が判るまでに少なくとも３時間は必要である。これに対し本発明によれば、テスト結果は、５－２０分以内で得られる。

本発明による分析装置を、図面に示した実施態様に基いて更に詳細に説明する。内部が見えるような図面の形式によつて、分析装置を示した。かかる装置は、液体を入れる穴２を備えたサンプル受けプレート１からなる。該穴２には、下から環状の溝３が設けられており、この溝にはＯ－リング４が部分的にある。全体を取り付けた状態では、Ｏ－リング４は、担体５に適合しており、担体５

して担体の細孔は圧力によつて完全に閉じられ、側面の細管から液体が流出することがさけられる。溝の部分では、かなりの高圧となつており、従つてひずんだ物体は、両側の端においても、毛細管からの流出を防ぐのに好ましく使用される。

シールの部分に高い部分を設けることによつて好ましいシールが得られる。このことは、穴のまわりの比較的狭い領域にわたつて、シール自体に、例えば長円形のパッキング上にひだを設けて厚い部分を形成すること、あるいはサンプル受けプレート及び／又は支持プレート上に厚い部分を形成することを意味する。

本発明の方法あるいは装置を使用することにより、免疫学的測定法を非常に早く行なうことができる。これは、例えば性的感染による病気（STD）の場合に重要である。近年、STDの患者が多く、また違った感染媒体が増加しており、細菌、原生動物、菌類、ウイルスの間にも見られる。広範囲の疾患が、これらの感染媒体によつて引き起こされ、これら感染媒体が临床上にも、同様にして多

はまた、支持プレート８に設けられた溝７に部分的に存在するＯ－リング６にも適合している。該支持プレート８には、穴９が設けられており、これは現状の溝７に一致している。この支持プレート８は、容器１０にも適合することができ、適当なシール手段１１があつて、支持プレート８と容器１０の間の密閉を完全にしている。パイプ１２が容器１０から出ており、これは真空ポンプに連結している。

本発明による分析装置は、例えば西ドイツの Schleicher & Schuell によつて製造された種々のマイクロサンプル濾過装置の如き、ドット免疫結合測定法を行なうための商業的に入手し得る装置を用いて、造ることもできる。

上述した分析装置は、次のようにして使用することができる。

すなわち、先ず、抗原または抗体懸濁液の少量を、減圧下に、担体として用いられているニトロセルロースに適用する。これを行う際に、テンプレートを用いることができる。担体を次いで、支

持プレートとサンプル受けプレートの間にしつかりととめる。穴2によつて形成されるインキュベーションキャップ中に、マルチチャンネルピペットにより、抗体溶液を入れて、第1抗体あるいは抗原をインキュベーションする。同時に、空気注入口を開けて、容器10中の圧力を外気圧と平衡に保つようにする。ピペットで滴下後、空気注入口を閉じて、パイプ12に連結した真空ポンプをスタートさせる。真空ポンプは、目盛りが付いた蠕動性のポンプが好ましく、また容器10中には液体を満たしておいて、真空ポンプにより液体を吸引して、吸引濾過を正確に行なえるようにする。抗原-抗体反応は、通常のELISA法の如く、拡散せしめることによつては生じにくい。担体5として用いたニトロセルロースを通して吸引濾過することによつて、生起せしめることができる。これにより、反応時間を短縮することが可能である。これに関連して、支持プレートと担体との間に、O-リングを設けることによつて、漏くべきことに、液体の漏出が完全になくなる。シグナル発生

マ(20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  蛋白)、懸濁液5  $\mu\text{m}$ を、それぞれの抗原用スポットに、減圧下に入れた。担体は、密閉容器中で4°Cに保存してもよくまた約1分間乾燥後、使用することもできる。0.5% V/Vのツウィーン(Tween)20(PBS-Tween)を含むPBS200  $\mu\text{L}$ で、それぞれのスポットを、減圧下に洗った。PBS-Tweenで1:50に希釈した患者の血清200  $\mu\text{L}$ を、それぞれのスポットに加え、血清サンプルを、流速0.2  $\text{ml}/\text{cm}^2/\text{min}$ で、減圧下に担体を通して吸引した。次いでPBS-Tween200  $\mu\text{L}$ で洗い、PBS-Tweenで1:20,000に希釈した、セイヨウワサビペルオキシダーゼが結合したヤギ抗ヒト免疫グロブリン抗体200  $\mu\text{L}$ を、流速0.2  $\text{ml}/\text{cm}^2/\text{min}$ で担体を通して吸引した。PBS-Tween200  $\mu\text{L}$ で減圧下に、3回、担体を洗った。次いで、テトラメチレンベンジジン(1.2  $\text{mg}/\text{ml}$ )、過酸化水素(0.003%)、酢酸ナトリウム(6.8%)及びクエン酸(1.4%)を含む基質溶液200  $\mu\text{L}$ を加え、3分間インキュベーション後、吸引した。

システムが結合した結合体、および基質についての工程は、通常のELISA法と同様に行なわれる。

半微量滴定プレートを、液体用パイプシステムを設けた真空室中に備えることにより、濾液を集めることもできる。液体の除去は、殺菌剤として塩素漂白剤(chlorbleachinglye)を加えた空気/液体分離フラスコにより、行なうことができる。

上述した実施態様は、本発明の好ましい態様であるが、本発明はこれらに限定されるものではなく、本発明の概念の範囲内において、当業者は本発明を変化せしめることができる。

次に本発明を実施例により更に詳細に説明する。

#### 例 I

##### 抗体の検出(非競合法)

前述した分析装置を用いて、分析を行なつた。

ニトロセルロース膜(細孔サイズ0.45  $\mu\text{m}$ )を、蒸留水で湿らせた。0.005% W/Vのツグイターゲント(Zwittergent)3-14を含む、リン酸緩衝食塩水(PBS)中の梅毒トレポネー

ア(20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  蛋白)懸濁液5  $\mu\text{m}$ を、それぞれの抗原用スポットに、減圧下に入れた。担体は、密閉容器中で4°Cに保存してもよくまた約1分間乾燥後、使用することもできる。0.5% V/Vのツウィーン(Tween)20(PBS-Tween)を含むPBS200  $\mu\text{L}$ で、それぞれのスポットを、減圧下に洗った。PBS-Tweenで1:50に希釈した患者の血清200  $\mu\text{L}$ を、それぞれのスポットに加え、血清サンプルを、流速0.2  $\text{ml}/\text{cm}^2/\text{min}$ で、減圧下に担体を通して吸引した。次いでPBS-Tween200  $\mu\text{L}$ で洗い、PBS-Tweenで1:20,000に希釈した、セイヨウワサビペルオキシダーゼが結合したヤギ抗ヒト免疫グロブリン抗体200  $\mu\text{L}$ を、流速0.2  $\text{ml}/\text{cm}^2/\text{min}$ で担体を通して吸引した。PBS-Tween200  $\mu\text{L}$ で減圧下に、3回、担体を洗った。次いで、テトラメチレンベンジジン(1.2  $\text{mg}/\text{ml}$ )、過酸化水素(0.003%)、酢酸ナトリウム(6.8%)及びクエン酸(1.4%)を含む基質溶液200  $\mu\text{L}$ を加え、3分間インキュベーション後、吸引した。

表 A		
診 断	血清サンプル数	陽性血清サンプル数(%)
梅毒患者	151	146(96.7)
非梅毒患者	504	3(0.6)

#### 例 II

##### 抗体の検出(競合法)

上記した如き非競合法による抗体検出と同様にして、分析を行なつた。患者血清を反応せしめ、PBS-Tweenで洗浄後、PBS-Tweenで1:20,000に希釈した、セイヨウワサビペルオキシダーゼが結合した梅毒トレポネーマに対するモノクローナル抗体200  $\mu\text{L}$ を加え、流速0.2  $\text{ml}/$

cm<sup>2</sup>/min で、担体を通して吸引した。PBS - Tween 200  $\mu$ L で3回洗浄後、蒸留水を上述した方法と同様にして加え、3分間インキュベーション後、吸引した。発色反応の強度を、セイヨウワサビペルオキシダーゼが結合したモノクローナル抗体とインキュベーションした抗原と比較した。患者の血清中の抗体によつて阻止された場合には、発色反応の強度は、2+から1+または陰性に変化した。梅毒患者及び非梅毒患者からの血清サンプルについての分析結果を、表Bに示した。

表 B

診 断	血清サンプル数	阻止を示した血清サンプル数(%)
梅毒患者	10	8 (80)
非梅毒患者	10	0 (0)

## 例 III

## 抗体の検出(非競合法)

PBS で1:200に希釈した梅毒トレポネーマに対するモノクローナル抗体5  $\mu$ Lを、それぞれ

のスポットに減圧下に加えた。約1分間乾燥後、PBS - Tween 200  $\mu$ L で減圧下に洗浄した。0.05%のTween 20を含む、PBS中の梅毒トレポネーマ懸濁液200  $\mu$ Lを加え、流速0.2 ml/cm<sup>2</sup>/minで担体を通して吸引した。E. coli 懸濁液をコントロールとして使用した。担体を、PBS - Tween 200  $\mu$ L で減圧下に洗った。PBS - Tween で1:10,000に希釈した、梅毒トレポネーマに対するセイヨウワサビペルオキシダーゼが結合したモノクローナル抗体200  $\mu$ Lを加え、流速0.2 ml/cm<sup>2</sup>/minで担体を通して吸引した。PBS - Tween 200  $\mu$ L で減圧下に3回洗浄後、例Iと同様にして蒸留水を200  $\mu$ Lを加え、3分間インキュベーション後、吸引した。青緑色のスポットが現われることによつて、分析対象である懸濁液中に梅毒トレポネーマが存在することが示される。各種量の梅毒トレポネーマを含むサンプルについての分析結果を表Cに示した。コントロールであるE. coliの場合には、陰性を示した。

表 C

梅毒トレポネーマ数(1 ml中)	結 果
$1 \times 10^8$	陽 性
$5 \times 10^7$	陽 性
$1 \times 10^7$	陽 性
$5 \times 10^6$	陰 性
$1 \times 10^6$	陰 性

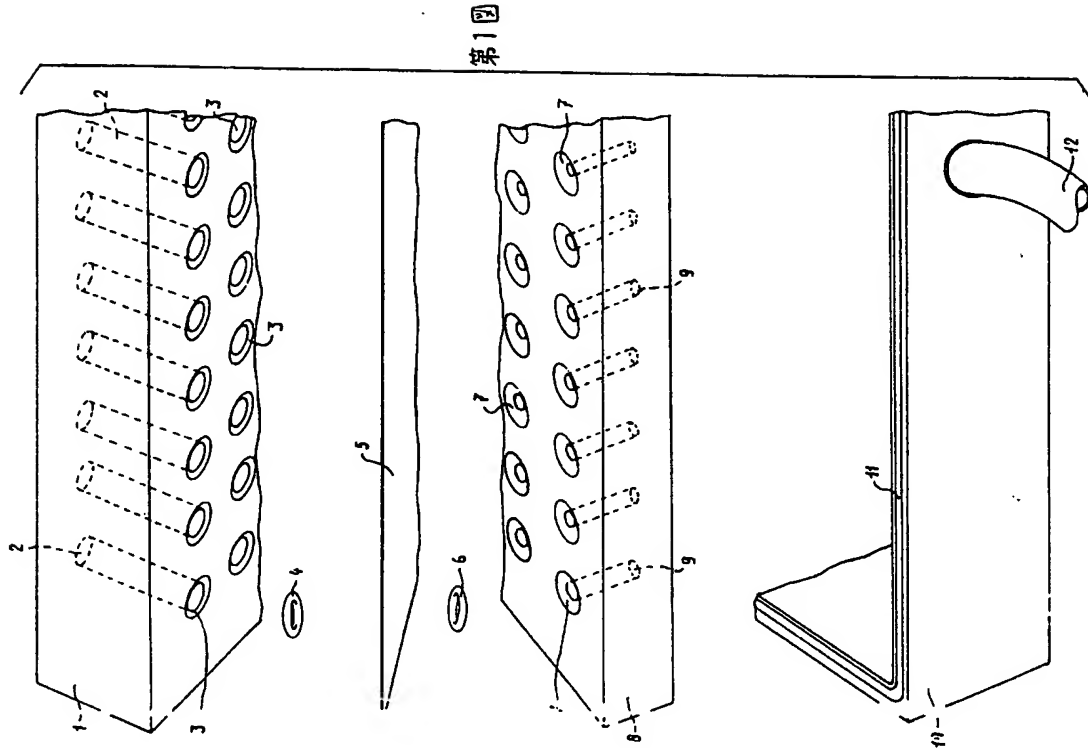
## 4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明方法を実施するための分析装置を示す。

1: サンプル受けプレート、2: 穴、3: 環状の溝、4: O-リング、5: 担体、6: O-リング、7: 環状の溝、8: 支持プレート、9: 穴、10: 容器、11: シール手段、12: パイプ。

代理人 浅 村 皓





# 手続補正書(方式)

昭和62年4月24日

特許庁長官殿

## 1. 事件の表示

昭和62年特許願第 5879 号

## 2. 発明の名称

リガンド-レセプター対の一方を検出する方法、  
リガンド-レセプター対の一方が結合した担体の  
調製法及びこれら方法実施のために好適な分析装置

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所

氏 名

(名 称)

オランダ国

## 4. 代 理 人

住 所

〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号

新 大 手 町 ビ ル デ ィ ン グ 3 3 1

電 話 (211) 3 6 5 1 (代 表)

氏 名

(6669) 浅 村

皓

## 5. 補正命令の日付

昭和62年3月31日

## 6. 補正により増加する発明の数

名称及び

471

## 7. 補正の対象

加害の特許出願人(法人)代表者氏名の欄  
代理権を証明する書面  
政府機関証明書  
明 細 書

## 8. 補正の内容

別紙のとおり

明細書の修正(内容に変更なし)

## 9. 添付書類の目録

理由書 1通